

## 血管内皮機能の改善効果を有するヨーグルトをヒト試験で確認 ～動脈硬化予防に、腸内細菌のポリアミン産生を促す技術が有効～

メイトーブランドの協同乳業株式会社(本社:東京・中央区/社長:尾崎 玲)の松本光晴主幹研究者らは、京都府立医科大学の内藤裕二准教授との共同研究で、BMIが高めの健常成人を対象に、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを含むヨーグルトを摂取することにより、腸内細菌による生理活性物質ポリアミン産生を誘導し、血管内皮機能を改善することを明らかにしました。この研究成果は、国際学術誌Nutrientsに公開されました(Nutrients 2019, 11: 1188, doi:10.3390/ nu11051188)。

### 《ポイント》

- 動脈硬化が引き起こす心筋梗塞や脳卒中は日本人の4人に1人が亡くなる病気である。動脈硬化発症プロセスにおいて、血管内皮機能(血管のしなやかさ等)の低下は最初に生じるため、この機能の維持・改善は動脈硬化およびこれらの疾患の予防に繋がる。
- ポリアミンは、抗炎症作用やオートファジー誘導作用等により、動脈硬化および心血管系疾患への有効性が期待されている物質である。当研究所では、腸内細菌を利用してポリアミンを産生し、生体に供給する独自技術を開発済みで、その技術を応用したヨーグルトを作製し、BMIが高めの健常成人を対象に無作為化二重盲検並行群間比較試験を実施した。
- 本ヨーグルトの1日1カップ(100g)、12週間の摂取で、血管内皮機能がプラセボ群と比較し有意に改善された。また、それと連動して本ヨーグルト摂取群の血圧がプラセボ群より低い傾向を示した。
- 中性脂肪や悪玉コレステロール等、動脈硬化の増悪因子を軽減する食品は多数報告されているが、ヒト試験で血管組織に直接的に作用し、改善効果を示した食品は世界初と考えられる。

### 《研究概要》

生理活性物質ポリアミン(プトレッシン、スペルミジン、スペルミン等の総称)は、抗炎症作用やオートファジー誘導作用等が報告されており、動脈硬化および心血管疾患予防への有効性が期待されています。生体のポリアミン合成力は加齢に伴い減少することから、中高年者は体外から補充するのが好ましいと考えられています。当社では、腸内細菌の産生するポリアミンに着目し、腸内細菌を利用してポリアミンを増やし生体に供給する技術として、ビフィズス菌(LKM512菌株)とアミノ酸の1種であるアルギニンの併用摂取法を開発済みで、その作用機序は「ハイブリッド・ポリアミン生合成機構」として遺伝子レベルで解明しました。本研究では、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを含むヨーグルト(LKM512+Argヨーグルト)と、これらを含まない通常ヨーグルト(プラセボ)を作製し、動脈硬化発症初期段階で低下する血管内皮機能への効果を無作為化二重盲検並行群間比較試験で評価しました。

BMIが高めの健常成人を2グループに分け、LKM512+Argヨーグルトあるいはプラセボを1日1回(100g)、12週間摂取してもらい、血管内皮機能等を測定しました。その結果、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較して、血管内皮機能の有意な改善効果が認められました。また、この効果を裏付けるように、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較し、摂取12週目に血圧が低い傾向を示し、血小板数が有意に改善されていました。さらに、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較し、糞便中プトレッシン(スペルミジンの前駆体)が有意に高濃度となり、同時に血清スペルミジンが有意に高濃度になりました。これらの結果は、LKM512+Argヨーグルトの摂取により大腸内でプトレッシンが増加し生体に吸収され、その後、生体内でプトレッシンより生成されたスペルミジンの作用により血管内皮機能が向上したことを示唆しています。動脈硬化予防のための中性脂肪や悪玉コレステロールを低下させる食品(食成分)は多数報告されていますが、ヒト試験で、血管内皮機能に直接的に作用し、動脈硬化予防への可能性を示した食品は世界初と考えられます。また、腸内環境研究分野においては、個体差の大きい腸内細菌に特定の有用物質を産生させ、その血中移行を確認し、保健効果を得ることに成功した重要な知見となります。

## 《参考資料》

### ■研究背景と目的

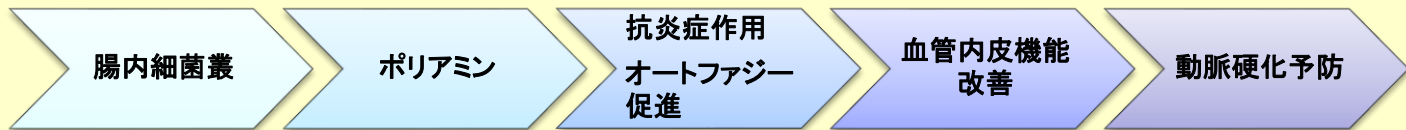
心筋梗塞や脳卒中などの心血管系疾患により日本人の4人に1人が亡くなるのですが、これを引き起こすのが動脈硬化です。動脈硬化の発症の初期段階には血管内皮機能、いわゆる「血管のしなやかさ」の低下がみられます。このため、血管内皮機能低下の早期抑制は心血管疾患の発症予防に極めて有効と考えられています。

ポリアミン(プトレッシン、スペルミジン、スペルミン)は全生物の細胞内に普遍的に含まれている生理活性物質で、様々なストレスから核酸を保護し細胞増殖や分化に重要な役割を果たすことから、細胞の健全性を維持する物質と考えられています。しかし、成長期の終わりと共に加齢に伴い生体内合成能が低下し、我々はこれが老化と関わっていると考えています。事実、複数のグループより、モデル生物への外因性ポリアミンの供給(動物は飼料を介した経口投与)で寿命延長効果が報告され、アンチエイジングに効果的な生体への介入の一つとしてハイインパクト・ジャーナルで紹介されるなど注目されています(Cell 157: 1515, 2014)。さらに、ポリアミン(特にスペルミジン、スペルミン)は抗炎症作用とオートファジー誘導作用を有することから、血管壁への炎症性リンパ球の接着や血管内皮細胞の健全性の維持作用を有し、動脈硬化さらに心血管疾患の予防への有効性が期待されています(J. Immunol. 175: 237-245, 2005; Science 359: eaan2788, 2018.)。

我々は、約20年間に渡り、外因性ポリアミンとして恒常的に腸管腔内で生合成され生体へ供給される腸内細菌叢由来ポリアミンに着目しており、「食による腸内細菌叢のポリアミン産生誘導により生体にポリアミンを供給すれば、細胞の健全化が維持され、老年病の予防や軽減に繋がる」と仮説を立案し、そのための技術開発と効果検証を進めて来ました。一連の研究で、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを併用して経口投与することにより、腸内細菌叢の個体差を超越して多くの個体で腸内プトレッシン(強い生理活性を有するスペルミジン等の前駆体)濃度を高める技術の創出に成功しました。更に、このプトレッシン産生促進機序を腸内細菌の遺伝子レベルで解明し、「ハイブリッド・ポリアミン生合成機構」として発表し、ヒト腸管内でも普遍的に作動していることを見出しました(Sci. Adv. 4: eaat0062, 2018)。

このような背景のもと、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを効率的濃度で配合した新規機能性ヨーグルトを開発し、BMIが高めの健常成人を対象に、腸内ポリアミンの増加に起因する血管内皮機能の改善効果を評価するヒト臨床試験を実施しました。

### 本研究の思考基盤



### ■試験方法

BMIが30未満且つ喫煙習慣のない健常成人(30-65歳)を公募し、血液データ等から医師が健常成人と判定した44名の被験者を対象に実施しました(被験者数はパワーアナリシスで決定しました)。被験者を2グループに分け、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを含むヨーグルト(LKM512+Argヨーグルト)100gまたはプラセボ<sup>\*1</sup> 100gを1日1回、12週間摂取する無作為化二重盲検並行群間比較試験<sup>\*2</sup>を実施しました。摂取前と摂取12週目に、主要評価項目としてEndoPAT<sup>\*3</sup>検査で血管内皮機能を測定し、副次評価項目として身体データ、血圧、血中バイオマーカー、BMI、腹囲、糞便マーカーおよび安全性を評価しました。なお、EndoPAT検査、身体測定、及び尿と血液の採取は12時間以上の絶食条件下で行い、試験期間中は発酵乳、乳酸菌飲料、プロバイオティクス入りサプリメント、納豆など生菌を多量に含有する食品の摂取を禁止しました。また、糞便回収の際は、食事内容が糞便中の代謝産物に与える影響を排除するため、被験者が糞便提出日の前日に摂取する食事内容を統一しました。

本研究は大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システム(UMIN-CTR) (<http://www.umin.ac.jp/ctr/index-j.htm>)にて試験ID:UMIN000023857として登録されています。

\*1 プラセボ: 有効成分を含まない試験食と見分けがつかない試験薬品あるいは食品。本研究では、ビフィズス菌LKM512とアルギニンを含まない通常ヨーグルトをプラセボとした。

\*2 無作為化二重盲検並行群間比較試験: 被験者を試験食摂取グループとプラセボ摂取グループに無作為に分け、両群で、同じ期間、試験食を摂取する試験。それぞれのグループで得られた結果を比較評価することで、試験薬品(食品)の効果の有無を判断する。被験者および臨床試験実施に関わる全人物が、被験者がどちらのグループに属するかを一切知らずに実施し、全データ確定後に統計処理をする。

\*3 EndoPAT: 血管内皮機能を測定するための検査機器。指先から反応性充血指数(RHI)を測定することで、生体に傷をつけることなく血管内皮機能を測定することができる。従来法より、心血管疾患の早期段階での血管内皮機能障害を感知できるとされている。操作が簡単でオペレーターによる測定誤差が少ないのも特徴である。

## ■結果および考察

### 【血管内皮機能】

EndoPAT検査の結果、LKM512+Argヨーグルト群の摂取前後の血管内皮機能(RHI: 反応性充血指数)の変化量がプラセボ群と比較して有意に高くなりました( $p < 0.05$ , two-way ANOVA) (図1-a)。また、LKM512+Argヨーグルト群内のRHIは、摂取前後で有意に上昇しましたが( $p < 0.01$ , paired  $t$ -test)、プラセボ群は変化がありませんでした(図2-b)。これらの結果は、LKM512+Argヨーグルト摂取により血管内皮機能が改善したことを示しています。これまでのEndoPATを使用した多検体のデータより、RHIが1.67未満は血管内皮機能障害を示すとされており、LKM512+Argヨーグルト摂取群で、RHIが摂取前の1.50から摂取12週目に1.81に増加したことは、血管内皮機能が危険域から正常域まで回復したことを示しています。

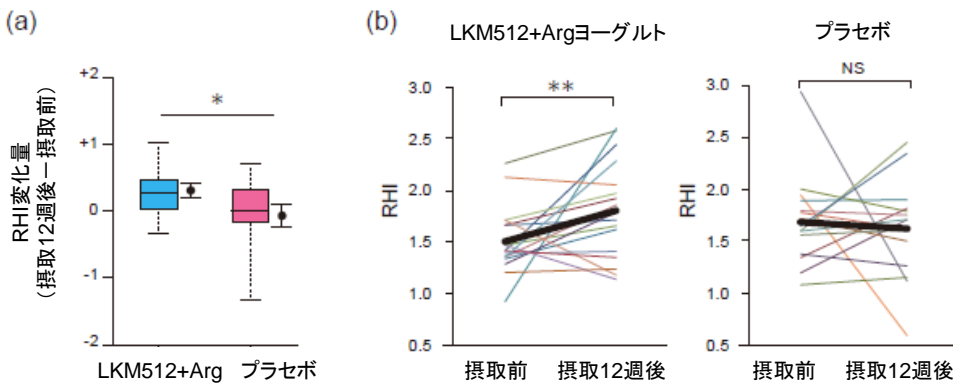


図1.LKM512+Argヨーグルトが血管内皮機能に与える影響

(a) 摂取前後のRHI変化量  
箱ひげ図のひげは5%値と95%値、箱は四分位範囲(25%-75%)、箱中の線は中央値を示し、箱ひげ図横に平均値(黒点)と標準誤差を表記した。 $* p < 0.05$  (Two-way ANOVA)  
(b) 各群内のRHI変化  
カラーの線は各被験者のスコアの変動を示し、黒い太線は平均値を表す。 $** p < 0.01$  (paired  $t$ -test); NS: 差なし

### 【血圧】

摂取前の測定値に群間差はありませんが、摂取12週目のLKM512+Argヨーグルト群は、収縮期血圧 $120.2 \pm 2.8$  mmHg、拡張期血圧 $75.1 \pm 2.2$  mmHg、プラセボ群は収縮期血圧 $125.3 \pm 2.5$  mmHg、拡張期血圧 $78.9 \pm 1.9$  mmHgと、両方共にLKM512+Argヨーグルト群が低い傾向を示しました( $p = 0.097$ , Student's  $t$ -test)。収縮期血圧と拡張期血圧がそれぞれ115mmHgと75mmHg以上になると心血管疾患の発症リスクが上昇しますが、LKM512+Argヨーグルト群の収縮期血圧は122.4mmHgから120.2mmHgへ、拡張期血圧は77.9mmHgから75.1mmHgへと正常値に近づきました。血管内皮機能と血圧は相互に強く影響を受けており、動脈硬化の進行に伴い両者共に悪化します。血管内皮機能の改善が認められたLKM512+Argヨーグルト群で血圧が低下傾向を示したことは論理的に妥当な結果で、LKM512+ Argヨーグルトが動脈硬化の予防に有用であることを示しています。

### 【血中マーカー】

① 血小板: 血小板濃度を比較した結果、その変化量はLKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較して有意に低く( $p < 0.05$ , two-way ANOVA)、改善されたことが認められました(図2-a)。また、血小板濃度の各群内の摂取前後の値の比較では、プラセボ群では差が認められなかったのに対し、LKM512+Argヨーグルト群では、有意な減少が認められました( $p < 0.01$ , paired  $t$ -test)。血小板は、動脈の傷ついた部分を補修する役割がありますが、血管の損傷と血小板による補修が繰り返されると血管が狭くなり、血流が滞る原因にもなります。LKM512+Argヨーグルト摂取による血小板の減少は、血管内皮機能の正常化を裏付ける証拠であると同時に、動脈硬化や心血管疾患のリスクが減少したことを示します。

② 中性脂肪: 血中の中性脂肪濃度を比較した結果、その変化量はLKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較し、低い傾向を示し( $p = 0.085$ , two-way ANOVA)、改善される傾向が認められました(図2-b)。また、LKM512+Argヨーグルト群は、摂取前 $129.3 \pm 15.0$  mg/dlから12週目 $103.9 \pm 12.9$  mg/dlと有意に減少していました( $p < 0.05$ , paired  $t$ -test)。中性脂肪は動脈硬化症の危険因子で、心血管疾患の発症率と相関関係があることが知られており、これらのリスクが減少したことを示唆しています。

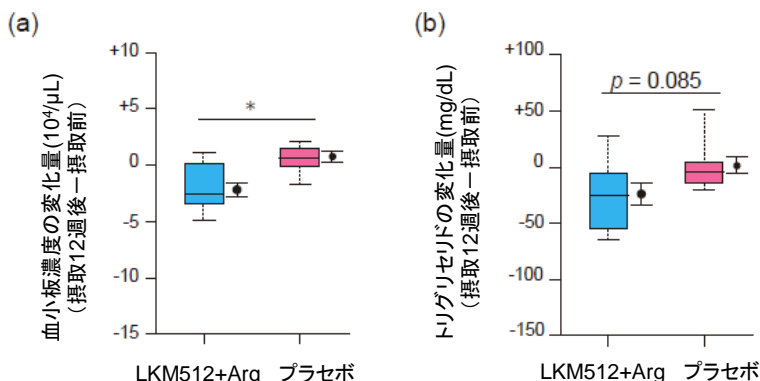


図2.LKM512+Argヨーグルトが血小板濃度と中性脂肪(トリグリセリド)に与える影響

(a) 血小板濃度の変化量  
(b) 中性脂肪の変化量  
箱ひげ図のひげは5%値と95%値、箱は四分位範囲(25%-75%)、箱中の線は中央値を示し、箱ひげ図横に平均値(黒点)と標準誤差を表記した。 $* p < 0.05$  (Two-way ANOVA)

③ HDL(善玉)コレステロール: 心血管疾患の発症率と負の相関性を示すHDL-コレステロールは、群間差は認められなかったものの、LKM512+Argヨーグルトの摂取により、摂取前の $57.4 \pm 3.3$  mg/dlから、12週目には $60.4 \pm 3.4$  mg/dlに有意に増加しました( $p < 0.05$ , paired  $t$ -test)。これは、心血管系疾患のリスクの低下を示唆しています。

④ 炎症性サイトカイン<sup>\*4</sup>: 血清中のTNF- $\alpha$ とIL-1を測定し、共に群間差は認められませんでした。炎症状態の指標で汎用されるTNF- $\alpha$ は、血中濃度が6.0 pg/ml以上になると心血管疾患のリスクが上昇することが知られていますが、本研究では、最高濃度の被験者でも0.94 pg/mlであったため、全被験者が炎症状態でなかったことを示唆しています。

\*4 炎症性サイトカイン: サイトカインは細胞から分泌されるタンパク質で、細胞同士が連絡をとりあう情報伝達の役割を果たしている。炎症性サイトカインは炎症を誘導あるいは増強する働きをもつ。

### 【ポリアミン濃度】

① 糞便ポリアミン濃度: LKM512+Argヨーグルト群の糞便中プトレッシン濃度はプラセボ群と比較して有意に高濃度を示しました( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。一方、スペルミジンに群間差は認められませんでした(図3-a)。これは、想定通りに、LKM512+Argヨーグルト摂取により腸内細菌叢がプトレッシンを産生したことを示しています。

② 血清ポリアミン濃度: 血管組織(血管内皮細胞)に作用するポリアミンは血液中を遊離しているポリアミンです。したがって、血球(赤血球や白血球)内に含まれるポリアミンは含まないよう、血清中のポリアミンを測定対象とし、血清中の微量ポリアミンの測定系をガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS)にて構築し、測定しました。その結果、LKM512+Argヨーグルト群は、血清プトレッシン濃度及びスペルミジン濃度共にプラセボ群と比較して有意に高濃度であることが認められました( $p < 0.05$ ) (図3-b, Student's  $t$ -test)。

これらの結果は、LKM512+Argヨーグルトの摂取で大腸内で腸内細菌叢のハイブリッド・ポリアミン合成機構により産生されたプトレッシンが吸収され血中に移行し、更に生体内で生理活性を有するスペルミジンに変換されたことを示唆しています。なお、糞便および血清共にスペルミンは殆どの被験者サンプルで検出限界以下でした。

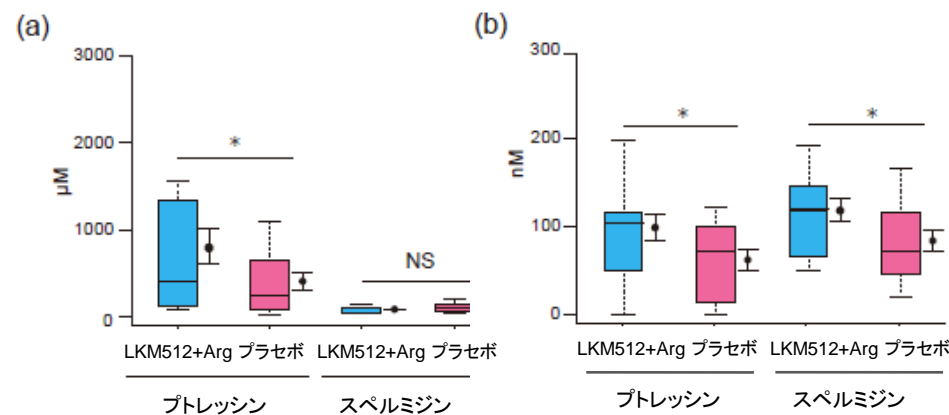


図3.LKM512+Argヨーグルトが糞便中と血清中のプトレッシン及びスペルミジン濃度に与える影響

(a) 摂取12週目の糞便中プトレッシン濃度とスペルミジン濃度 \*  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test)

(b) 摂取12週目の血清中プトレッシン濃度とスペルミジン濃度

箱ひげ図の箱は四分位範囲(25%-75%)、箱中の線は中央値を示し、箱ひげ図横に平均値(黒点)と標準誤差を表記した。\*  $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test)

### 【糞便細菌叢】

16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンスで解析しましたが、主成分分析で両群が別のクラスターを形成するレベルでの差は認められませんでした。同じく、多様性にも群間差は認められませんでした。一方で、ハイブリッド・ポリアミン合成機構に関連している菌種が含まれるEnterococcus属およびCitrobacter属の相対存在率はLKM512+Argヨーグルト摂取群でプラセボ摂取群と比較し有意に高く検出されました( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。この結果は、LKM512+Argヨーグルトの摂取により、ハイブリッド・ポリアミン合成機構に関連している細菌グループが増加した可能性を示唆しています。

### 【作用機序】

得られたデータから、以下のようなメカニズムを考えています。

LKM512+Argヨーグルトの摂取により、①ハイブリッド・ポリアミン合成機構が作動し、腸管内でプトレッシンが増加、②それが生体内へ移行しスペルミジンに変換され、③スペルミジンの生理機能(オートファジー誘導作用と抗炎症作用)により血管内皮機能が改善された。(但し、本試験は健常成人を対象にしており、汎用される炎症マーカー(TNF- $\alpha$ )値が心血管系疾患のリスクが上昇する血中基準濃度より大幅に低く、また炎症性マーカーに群間差がなかったことから抗炎症作用を裏付けるデータはなく、残されたオートファジーが関与している可能性が高いと推測している。)

但し、ヒト動脈を用いてオートファジー活性を評価するのは困難であるため、本試験においてもオートファジーが活性化したことを示すデータは得られておらず、作用機序の証明は、今後の課題となります。

## ■安全性

試験期間中、プラセボ群で1名が下痢を発症したが、その他の副作用はLKM512+Argヨーグルト群およびプラセボ群でも生じず、安全性が確認された。

## ■まとめ

我々が知る限り、動脈硬化予防を目的として、ヒト臨床試験で血中脂質等の改善を示した食品素材やプロバイオティクスは存在しますが、本疾病と直接的に関連している血管内皮機能に有効性を示した報告はありませんでした。従いまして、このヨーグルトは、血管内皮機能の改善効果が認められた初めての食品と考えられます。

また、この成果は、ヒト臨床試験で、個体差の大きい腸内細菌叢に標的の生理活性物質産生を誘導し、それが血中内に移行し、その生理活性を介して目的とした保健効果を得た最初の研究成果であり、腸内環境学分野にとりましても、重要な知見と考えられます。

さらに、これまで実施してきた一連の研究は、メタボロミクスを用いて糞便中の低分子代謝産物を探索するための手法構築等の基礎的研究に始まり、それを利用してポリアミン濃度増強物質の探索研究とマウスを用いた評価研究、さらに食品化への応用を目指した技術開発、また、この技術によるポリアミン産生のメカニズムを再度基礎的研究に戻って遺伝子・分子レベルで解明した上で、今回のヒト臨床試験で狙った効果が得られたという経緯を有し、科学的根拠のある保健機能食品の開発モデルとしても、過去にない、高い価値を有すると考えています。

## 【論文】

ジャーナル: Nutrients

タイトル: Endothelial function is improved by inducing microbial polyamine production in the gut: A randomized placebo-controlled trial

(日本語訳: 血管内皮機能は腸管内で腸内細菌のポリアミン産生誘導により改善される: 無作為化二重盲検試験)

著者: Mitsuharu Matsumoto<sup>1</sup>, Yusuke Kitada<sup>1</sup>, and Yuji Naito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>協同乳業株式会社研究所技術開発グループ, <sup>2</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学教室